

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
*Medicinska kemija*

*Klara Vukić*

***Antiproliferativni učinak ekstrakata i frakcija Eunicelle cavolini na  
fibroblaste ljudskog prepucija***

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
*Medicinska kemija*

*Klara Vukić*

***Antiproliferativni učinak ekstrakata i frakcija Eunicelle cavolini na  
fibroblaste ljudskog prepucija***

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: *prof. dr. sc. Dean Marković*

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate university study  
*Medical chemistry*

*Klara Vukić*

***Antiproliferative effect of extracts and fractions of Eunicella  
cavolini on human foreskin fibroblasts***

Final work

Rijeka, 2019.

Diplomski rad obranjen je dana 27.09.2019. pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Karlo Wittine, predsjednik
2. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić, član
3. prof. dr. sc. Dean Marković, član

Rad ima 38 stranica, 8 slika, 7 tablica i 52 literaturna navoda.

## **Zahvala**

*Veliku zahvalnost dugujem mentoru prof. dr. sc. Deanu Markoviću na trudu, razumijevanju te angažiranosti pri izradi mog diplomskog rada.*

*Posebno se zahvaljujem kolegici Petri Grbčić koja mi je uvelike olakšala izradu diplomskog rada svojom suradnjom i strpljenjem.*

*Zahvaljujem se kolegicama Elizabeti Rus i Vedrani Tolić na ogromnoj potpori tijekom izrade diplomskog rada.*

*Ovaj diplomski rad izrađen je u centru za visokopropusne tehnologije te se zahvaljujem pristupu znanstvenoj opremi koja je korištena za njegovu izradu projekta Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci“ financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn.*

## SAŽETAK

Gotovo 50% citotoksičnih spojeva izolirano je iz morskih organizama kao što su spužve i koralji. Koralji, uglavnom meki, potencijalni su izvori mnogih jedinstvenih metabolita, uključujući citotoksične i antitumorske spojeve. Ciljevi ovog istraživanja bili su analiziranje u kojem otapalu tijekom ekstrakcije dobijemo najveću masu ekstrakata te ispitivanje antiproliferativnog učinka dobivenih ekstrakata i frakcija na fibroblastima ljudskog prepucija. Pokazali smo kako je izbor polarnijeg otapala bolji pri ekstrakcijama *Eunicella cavolini*. Nadalje, uzorak dobiven ekstrakcijom pomoću smjese otapala diklorometana i metanola frakcionirali smo na koloni te frakcije koristili za analiziranje antiproliferativnog učinka. Nakon MTT testova, najjači antiproliferativni učinak vidljiv je u djelovanju uzorka pripremljenog pomoću smjese heksana i etil-acetata (50:50) gdje je inhibicija proliferacije stanica za 50% vidljiva već pri koncentraciji od 0.69 µg/ml. Sličan, ali slabiji utjecaj na proliferaciju stanica imali su uzorci pripremljeni pomoću smjese etil-acetata i metanola (80:20) i čistog etil-acetata. Najmanja koncentracija potrebna za ubijanje 50% stanica također je dobivena kod uzorka pripremljenog pomoću smjese heksana i etil-acetata (50:50).

**Ključne riječi:** Antiproliferativni učinak, ekstrakcija, *Eunicella cavolini*, fibroblasti, koralji

## **ABSTRACT**

Almost 50% of cytotoxic compounds are isolated from marine organisms such as sponges and corals. Corals, mainly soft corals, are potential sources of many unique metabolites including cytotoxic and anticancer compounds. The objectives of this study were to analyze the solvent extraction yield during the extraction and to investigate the antiproliferative effect of the obtained extracts and fractions on human foreskin fibroblasts. We have shown that the choice of polar solvents is better with the extracts of *Eunicelle cavolini* than the nonpolar solvent. Furthermore, the sample obtained by extraction with a mixture of dichloromethane and methanol solvent was fractionated on a column and these fractions were used to analyze the antiproliferative effect. After the MTT tests, the strongest antiproliferative effect is seen in the sample prepared by a mixture of hexane and ethyl acetate (50:50) where 50% cell proliferation inhibition is already apparent at a concentration of 0.69 µg/ml. Similar, but weaker, effect on cell proliferation had samples prepared using a mixture of ethyl acetate and methanol (80:20) and pure ethyl acetate. The minimum concentration required to kill 50% of the cells was also obtained in a sample prepared by a mixture of hexane and ethyl acetate (50:50).

**Key words:** Antiproliferative effect, corals, *Eunicella cavolini*, extraction, fibroblasts

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Morski bioaktivni spojevi.....	1
1.1.1. Antitumorska aktivnost morskih bioaktivnih spojeva .....	2
1.1.2. Antiviralna i antibakterijska aktivnost morskih bioaktivnih spojeva .....	5
1.2. Gorgonije .....	7
1.3. <i>Eunicella cavolini</i> .....	8
1.4. MTT test i citotoksičnost .....	10
2. CILJ RADA .....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Uzorci .....	14
3.2. Ekstrakcije koralja .....	14
3.3. Frakcioniranje uzoraka .....	15
3.4. MTT test preživljenja stanica .....	16
4. REZULTATI .....	17
4.1. Određivanje najboljeg otapala pri ekstrakciji <i>Eunicelle cavolini</i> ....	17
4.2. Ponavljanje ekstrakcija <i>Eunicelle cavolini</i> DCM/MeOH otapalom ...	18
4.3. Frakcioniranje DCM/MeOH ekstrakta <i>Eunicelle cavolini</i> .....	19
4.4. Analiza dobivenih ekstrakata i frakcija <i>Eunicelle cavolini</i> MTT testom preživljenja stanica .....	20
5. DISKUSIJA.....	27
6. ZAKLJUČAK.....	30
7. LITERATURA .....	31
8. ŽIVOTOPIS .....	37



## 1. UVOD

### 1.1. Morski bioaktivni spojevi

U povijesti upotrebe lijekova, reference na morske lijekove su oskudne. Međutim, poznato je da su se tisućama godina masti, preparati i kataplazme algi i morskog blata koristili za liječenje raznih bolesti, osobito u tradicionalnim kineskim i japanskim liječenjima (1). 1900. godine kainska kiselina, dobivena iz ekstrakta morske alge *Digenea simplex*, prvi je proizvod morskog podrijetla, a komercijalizirana je i korištena kao insekticid i anthelmintik (2). Međutim, tek 1950. godine identificirani su prvi lijekovi iz spužvi i morskih mikroorganizama. Nukleozidi spongotimidin i spongouridin, prvi spojevi izolirani iz spužve *Cryptotethya crypta*, dobiveni su slučajno (3). Sve veći broj dokumenata o morskim spojevima vezanih za ljudsko zdravlje objavljeno je u posljednjih dvadeset godina u mnogim različitim područjima znanja. Do danas je odobreno osam lijekova izoliranih iz morskih organizama za različite namjene (citarabin, vidarabin, zikonotid, etil esteri omega-3 kiseline, trabektedin, eribulin mesilat, brentuksimab vedotin i jota-karagenan). Pet od tih spojeva dobiveno je iz morskih beskralježnjaka i odobreni su za uporabu kao farmaceutski lijekovi u liječenju raka (4).

Velika većina životinja koje žive u oceanu spadaju u kategoriju beskralježnjaka, a većina znanstvenih istraživanja do sada povezanih s otkrićem morskih lijekova usmjerena je na ove organizme. U stvari, morski beskralješnjaci, kojima nedostaje kralježnica, identificirani su kao jedna od glavnih skupina bioloških organizama bogate raznolikosti i raspodjele (5). Beskralješnjaci se smatraju sveprisutnom i visoko taksonomski raznovrsnom skupinom jer se mogu naći od priobalja do abisalne zone. Najčešći morski beskralješnjaci su iz koljena spužvi, žarnjaka, mekušaca, člankonošca i bodljikaša te su osigurali značajan broj prirodnih proizvoda s farmakološkim svojstvima, od kojih su neki već u kliničkim ispitivanjima (6).

Kao odgovor na izloženost ekstremnim i promjenjivim staništima, ovi organizmi proizvode širok raspon sekundarnih metabolita koji se ne mogu proizvesti u drugim organizmima. Osim broja jedinstvenih prirodnih proizvoda koje stvaraju beskralježnjaci, raznolikost grupe čini ih jedinstvenim izvorom bioaktivnih spojeva (7). Danas su različiti bioaktivni spojevi iz različitih beskralježnjaka (puževi stošci, meki koralji, spužve, plaštenjaci, morski crvi, mahovnjaci, morski puževi i drugi morski organizmi) priznati kao važan izvor antitumorskih spojeva (8). Jedna studija pokazala je da je otprilike 75%, od do sada opisanih 20 000 morskih prirodnih spojeva, izvedeno iz morskih beskralješnjaka (9). Stoga se očekuje da se u budućnosti nastavi s istraživanjem morskih beskralješnjaka. 2012. godine sastavljena je znanstvena studija o postojećim morskim bioaktivnim spojevima te su otkrili da je oko 80% iz koljena spužvi (47,1%) i žarnjaka (33,5%). Ostali su bili iz koljena bodljikaša (7,4%), svitkovaca (6,0%) i mekušaca (5,0%). Također su usporedili morske bioaktivne spojeve po kemijskim skupinama i pokazali da kod spužvi ili žarnjaka, određena kemijska skupina nije uvijek prevladavala kroz istu vrstu (10). Tipični spojevi sa zdravstvenim prednostima dobiveni od beskralježnjaka uključuju polinezasićene masne kiseline, peptide, proteine, polisaharide, polifenole, saponine, sterole, minerale i druge bioaktivne spojeve kao što su pigmenti (npr. karotenoidi) (11). Do danas je iz morskih izvora pronađeno više od 20 000 novih kemikalija, a taj se broj svake godine povećava (7). Posljednjih godina ovi morski sekundarni metaboliti dali su znatan broj kandidata za lijekove, od kojih je većina još uvijek u pretkliničkom ili ranom kliničkom razvoju, a samo je ograničen broj već na tržištu (12).

### **1.1.1. Antitumorska aktivnost morskih bioaktivnih spojeva**

Neki morski prirodni spojevi su već dali obećavajuće rezultate u svojim pretkliničkim fazama te se ispituju u kliničkim ispitivanjima ili su čak odobreni od strane regulatorne agencije (12).

Trabektedin (Yondelis, ET-743), polusintetski tetrahidroizokinolin alkaloid izvorno izveden iz morskog plaštenjaka *Ecteinascidia turbinata*, bio je prvi morski antikancerogeni lijek odobren u Europskoj uniji za pacijente sa sarkomom mekih tkiva (13) (Tablica 1). PM1004, ili Zalypsis, srodan s Jorumycinom, prirodnim alkaloidom izoliranim iz kože i sluzi morskog puža *Jorunna funebris* i također nađen u spužvama i plaštenjacima (14). Ovaj spoj je u kliničkim studijama faze II zbog njegove navodne kemoterapijske aktivnosti protiv solidnih tumora te hematoloških malignih poremećaja (Ewingov sarkom, urotelijalni karcinom, karcinom endometrija, rak grlića maternice i multipli mijelom) (15).

**Tablica 1** Popis odobrenih morskih prirodnih spojeva iz beskralježnjaka od strane FDA i EMEA-e.

Organization and Year	Compound Name	Marine Organism	Chemical Class	Disease Area	Mode of Action	Company or Institution
FDA 1969	Cytarabine (Ara-C)	Sponge	Nucleoside	Anticancer	DNA polymerase inhibitor	Bedford, Enzon
FDA 2004	Ziconotide	Cone snail	Peptide	Pain	Modulator of neuronal calcium channels	Neurex Corp
EMA 2007	Trabectedin (E7389)	Tunicate	Alkaloid	Anticancer	Inhibits cancer cell growth of and affects the tumor microenvironment	PharmaMar
FDA 2010	Eribulin mesylate (E7389)	Sponge	Macrolide	Anti-breast cancer	Microtubule interfering agent	Eisai Inc.
FDA 2011	Brentuximab vedotin (SGN-35)	Mollusk	Antibody-drug conjugate	Lymphoma	CD30-directed antibody-cytotoxic drug conjugate	Seattle Genetics Inc.

Među klinički odobrenim poliketidima, eribulin mesilat (E7389) (Tablica 1), je inhibitor mikrotubularne dinamike koji pripada halikondrinskoj klasi antineoplastičnih lijekova. On je strukturalno pojednostavljen sintetički analog halikondrina B, prirodne tvari izolirane iz morske spužve *Halichondria okadai*. Eribulin inhibira mikrotubule u fazi rasta i pri tom ne utječe na fazu skraćivanja te cijepa tubulin u neproduktivne agregate. Antimitotički mehanizam djelovanja eribulina zbog njegovih učinaka na tubulin dovodi do blokade staničnog ciklusa u G2/M fazi, cijepanja diobenog vretena i, na kraju, do apoptotičke smrti stanice nakon produljene i

ireverzibilne blokade mitoze (16,17). FDA je odobrila E7389 za liječenje liposarkoma i raka dojke u 2010. (17).

Diskodermolid je spoj koji je 1990. godine prvi put izoliran iz rijetke spužve *Discodermia dissoluta* s dubine od 33 metra oko otočja Bahama. Spada u skupinu novih poliketidnih laktona i pokazuje citostatičko djelovanje po mehanizmu sličnom kao i Taksol koji se već primjenjuje u terapiji tumora. Međutim, čini se da je diskodermolid puno potentniji od Taksola protiv tumora koji su razvili otpornost na višestruke lijekove, s IC50 koncentracijom u niskom nanomolarnom rasponu (18). Bryostatin 1 je poliketid izoliran iz mahovnjaka *Bugula neritina* i izveden iz spužvi i plaštenjaka. Dokazano je da je ovaj spoj aktivan protiv višestrukih karcinoma i trenutno se podvrgava ispitivanjima faze I za liječenje Alzheimerove bolesti kao i za liječenje raka (19).

Iako u kliničkim ispitivanjima nije bilo spojeva iz obitelji terpena koji su se primjenjivali za liječenje raka, postoje podaci o uporabi tih spojeva u drugim bolestima. Primjerice, pseudopterozini, koji su diterpenski glikozidi iz mekog koralja *Pseudopterogorgia elisabethae*, pokazali su snažno protuupalno djelovanje te se pokazali kao dobro sredstvo za zacjeljivanje u kliničkom ispitivanju faze II (20). Štoviše, utvrdili su da su pseudopterozin E i pseudopterosin A učinkoviti u smanjenju edema kada se primjenjuju lokalno (21).

Najreprezentativniji farmaceutski proizvodi dobiveni iz morskih peptida koji su dospjeli na tržište su prirodni peptid zikonotid te derivat peptida brentuksimab vedotin (Tablica 1). Brentuksimab vedotin je odobreni derivat peptida proizveden kemijskom sintezom. Ovaj spoj ima jako antimitotičko djelovanje koje je usmjereno na protein CD30 stanične membrane. Odobren je od strane FDA u 2011. godini za liječenje Hodgkinovog limfoma (22).

Plitidepsin je morski ciklički depsipeptid (polimerni spoj s peptidnim i esterskim vezama), također poznat kao Aplidin, izoliran je iz mediteranskog plaštenjaka *Aplidium albicans* i sada je dostupan putem kemijske sinteze. Plitidepsin je u fazi III kliničkog istraživanja za nekoliko neoplazija, uključujući rak dojke, melanom i raka pluća ne-malih stanica. U

hematološkim stanicama raka, plitidepsin aktivira unutarnje i vanjske apoptotske putove pri nanomolarnim koncentracijama (23).

Glembatumumab vedotin je peptid u fazi II kliničkog istraživanja te je izoliran iz mekušaca i cijanobakterija. Trenutno se sintetizira za liječenje raka dojke i melanoma (24). Pinatuzumab vedotin, izoliran iz mekušaca i cijanobakterija, je u fazi I kliničkih pokusa. Pinatuzumab vedotin ima aktivnost protiv ne-Hodgkinovog limfoma i kronične limfocitne leukemije (25). Hemiasterlin (E7974), koji je također u pokusima faze I, je citotoksični tripeptid iz morskih spužvi *Hemiasterella minor*, *Cymbastela sp.* i *Auletta sp.* Spoj je pokazao snažan antimitotički učinak povezan s inhibicijom polimerizacije tubulina vezanjem na mjesto vezanja vinka alkaloida (26).

Citarabin (Ara-C) je sintetski spoj izveden iz spongotimidina, koji je izoliran iz morske spužve *Cryptotheca crypta*. Taj nukleozid je već odobren i komercijaliziran te se uglavnom koristi kod liječenja leukemije (27). Gemcitabin je nukleozidni analog (specifično, fluorirani derivat citarabina) u fazi II i III kliničkog razvoja i koristi se u različitim karcinomima, kao što su rak pluća ne-malih stanica, rak gušterače, rak mokraćnog mjehura i rak dojke (28). Konačno, dacinostat (LAQ824) je derivat sintetske hidroksamske kiseline u pokusima faze I koji inhibira histonske deacetilaze (koje su validirane mete za antitumorsku terapiju) pri nanomolarnim koncentracijama (29).

### **1.1.2. Antiviralna i antibakterijska aktivnost morskih bioaktivnih spojeva**

Antivirusni spojevi su trenutno od posebnog interesa budući da su virusne bolesti (npr. HIV, H1N1, HSV, itd.) postale jedan od glavnih ljudskih zdravstvenih problema posljednjih desetljeća. Sposobnost virusa da brzo evoluiraju i razviju otpornost na postojeće lijekove zahtijeva daljnji razvoj novih antivirusnih lijekova. Nekoliko vodećih antivirusnih spojeva izolirano je iz morskih spužvi te se nastoji identificirati nove spojeve (30).

Nukleozidi spongotimidin i spongouridin bili su prvi spojevi izolirani iz morske spužve *Tethya crypta* što je nadalje dovelo do sinteze Ara-C, antikancerogenog agensa i Ara-A, prvog antivirusnog lijeka. Ara-A inhibira sintezu virusne DNA pretvaranjem u adenin arabinozid trifosfat koji inhibira virusnu DNA polimerazu i sintezu DNA virusa herpesa, vaccinica i varicella zoster. Klinički se koristi za liječenje infekcije herpes virusom. Ara-A je bio jedini spoj spužvi koji je odobren od strane FDA-a kao antivirusni lijek, iako je njegov marketing kasnije zaustavljen jer je utvrđeno da je manje učinkovit i otrovniji od novijeg aciklovira (Zovirax). Osim nukleozida, morske spužve su također izvor mnogih alkaloida, sterola, terpena, peptida, masnih kiselina te peroksida koji pokazuju izvanrednu kemijsku raznolikost spojeva koji se nalaze u tim organizmima (31,32).

Nekoliko drugih antivirusnih spojeva dobivenih iz spužvi nalaze se u pretkliničkim odnosno kliničkim ispitivanjima za različite bolesti. Međutim, značajni problemi povezani s tim spojevima bili su veliko ograničenje u procesu razvoja i odobravanja lijekova. To je prvenstveno zbog brojnih tehnoloških izazova u otkrivanju, izoliranju, karakteriziranju i povećanju proizvodnje bioaktivnih spojeva iz morskih spužvi. Da bi se riješio ključni problem opskrbe, ulaže se veliki napor u uzgoj spužava, metagenomiku i mikrobiološku kultivaciju (30).

Osim dokazane antivirusne aktivnosti, niz diterpenoidnih d-metil laktona pokazali su blagu antibiotsku aktivnost. Crassin acetate koji može biti izoliran iz *Pseudoplexauva porosa*, *P. flagellosa* i *P. wagnaari* je aktivan protiv *Entamoeba histolytica*. Asperdiol izoliran iz *Eunicea asperula* i *E. toumeforti* pokazao je antikancerogenu aktivnost protiv *Klebsiella*, *Pseudomonasa* i in vitro stanične linije leukemije. Frakcija seskviterpena *Pseudopterogorgia rigida* sadržavala je fenol, hidrokinon i kinin, koji su pokazali blagu antibiotsku aktivnost. Fenol je inhibirao rast *S. aureus*. Gorgonska *Pterogorgia guadalupensis* sadrži lakton koji je pokazao blagu antibiotsku aktivnost protiv *S. aureus* i *Mycobacterium smegmatis* (33).

## 1.2. Gorgonije

Gorgonije pripadaju redu kožastih koralja, a to su koralji kojima nedostaje čvrsti kalcijev karbonatni kostur zbog čega su dobili naziv meki koralji. Umjesto toga, oni u svojim tijelima imaju sićušne dijelove nalik na kralježnicu zvane skleriti koji im daju određeni stupanj potpore. Poput tvrdih koralja, ove životinje tvore kolonije sitnih polipa koje su pričvršćene na tvrdi površinu. Kolonije mogu biti poput grančica, lepeze, guste ili obložene (34).

Gorgonije su bogat izvor biološki aktivnih proizvoda. Nekoliko spojeva pokazalo je širok raspon potentne bioaktivnosti, uglavnom antimikrobnih, antikancerogenih i protuupalnih. Jedan od antiinflamatornih spojeva, izoliranih iz karipske *Pseudopterogorgia elisabethae*, sada se prodaje u kozmetičkoj kremi "Resilience" tvrtke Estee Lauder. Osim proteina i polipeptida, klase spojeva koje proizvode gorgonije su prostaglandini, terpenoidi, steroli i diterpeni koji su pokazali snažnu protuupalnu aktivnost (35).

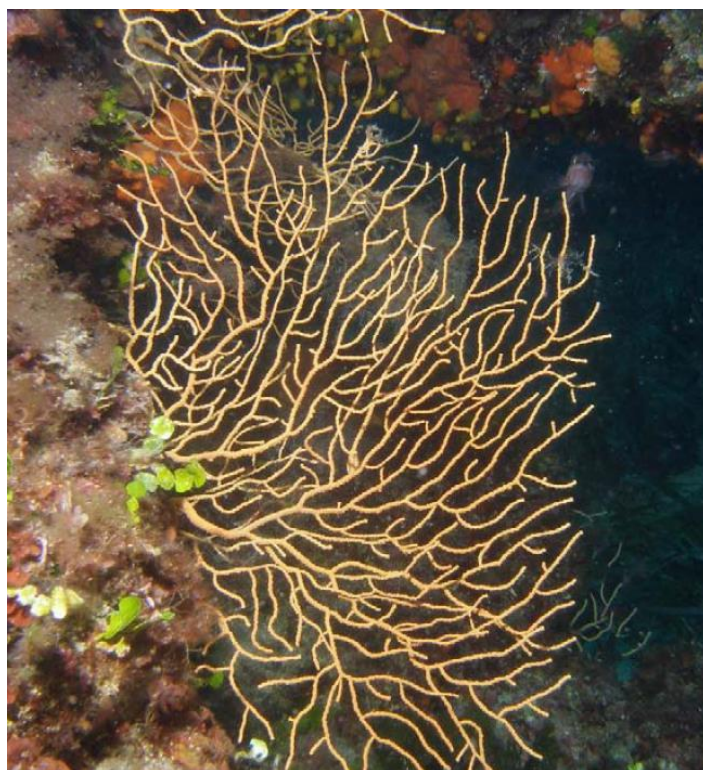
Krajem šezdesetih i početkom 1970-ih otkriveno je da neke gorgonije sadrže velike količine prostaglandina koji djelomično čine brzi rast morskih prirodnih proizvoda. Utvrđeno je da su koralji koji imaju antibakterijsko djelovanje *Antillogorgia turgida*, *A. americana*, *Rhipidogorgia flabellum*, *Briareum asbestinum*, *Plexaura homomalla*, *P. dichotoma* i *Plexauropsis crassa* (34).

Gorgonije s Kariba bili su prvi proučavani koralji za antimikrobnu aktivnost. Ekstrakti iz osam vrsta koralja s otočja San Blas u Panami pokazali su srednje razine antimikrobne aktivnosti protiv pet morskih i nemorskih bakterija. Utvrđeno je da su nepolarne frakcije mnogo aktivnije od polarnih frakcija. Ekstrakti nekoliko vrsta karipskih gorgonija bili su široko proučavani protiv 15 sojeva morskih bakterija te su sojevi izolirani iz zdravih i trulih gorgonija inhibirali rast bakterija zbog brojnih izvora bioaktivnih terpenoida koje posjeduju. Devet od deset gorgonijskih ekstrakata iz četiri ispitane obitelji pokazalo je antimikrobno djelovanje protiv gram-pozitivnih

bakterija. Ovi koralji, dakle, sadrže bogatstvo novih struktura s potencijalno korisnim biološkim aktivnostima (36).

### **1.3. *Eunicella cavolini***

*Eunicella cavolini*, žuti morski koralj koji izgledom podsjeća na lepezu, tipičan je za mediteranske obalne vode s visokim dubinskim rasponom (5-150 m), ali najobilnije stanište se nalazi na 10 do 30 m dubine. Vrlo je česta u zapadnom Sredozemnom moru i u Jadranskom moru, a rjeđe u istočnom dijelu. Član je roda *Eunicella*, koji u Sredozemnom moru predstavljaju druge dvije vrste: *E. singularis* i *E. verrucosa*. Pripada obitelji *Plexauridae*, redu *Alcyonacea*, podrazredu *Octocorallia* te razredu *Anthozoa* (37).

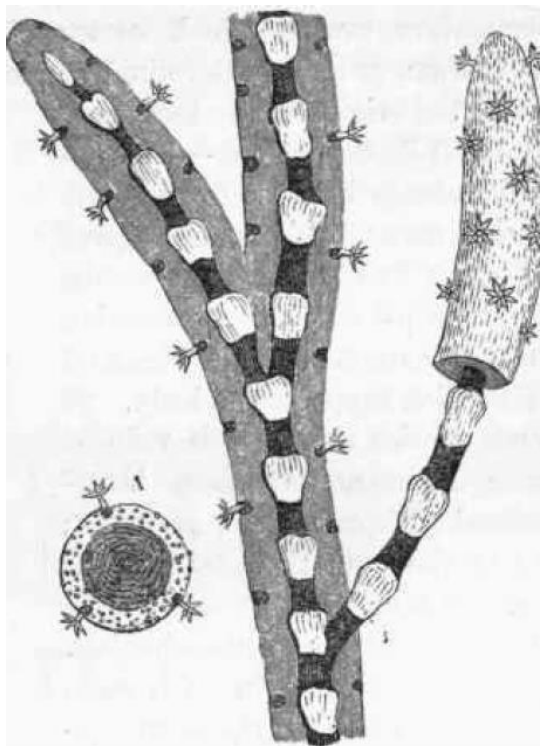


**Slika 1** Izgled *Eunicelle cavolini*.

O biologiji ove vrste malo se zna, a većina prethodnih studija bavila se njezinom ekološkom ulogom. *Eunicella cavolini* je žuta gorgonija koja



formira kolonije u obliku lepeze od oko 30-40 cm, ali može doseći veće dimenzije. Kolonije su raspoređene u obliku grane ili stabljike sa središnjom jezgrom. Jezgra je izrađena od proteina zvanog *gorgonin* koji je karakterističan za gorgonije te sadrži značajne količine joda i broma. Polipi su ugrađeni u želatinozni materijal koenenhim (eng. *coenenchyme*) koji okružuje jezgru. To je osnovna struktura gorgonije koja raste, razvija nove polipe što rezultira samim rastom gorgonija. U koenenhim prodiru kanali koji povezuju polipe tako da se održava hidraulički tlak kroz gorgonije. Materijal koji okružuje otvore u koenenhim (iz kojih se pojavljuju polipi) naziva se kaliks. Kolonije se mogu pričvrstiti na tvrdu površinu držačem ili mogu slobodno plutati. Morfologija (tj. oblik, grananje, metoda vezivanja) kolonije i oblik sklerita koriste se za razlikovanje vrsta (37).



**Slika 2** Presjek građe grane *Eunicelle cavolini*.

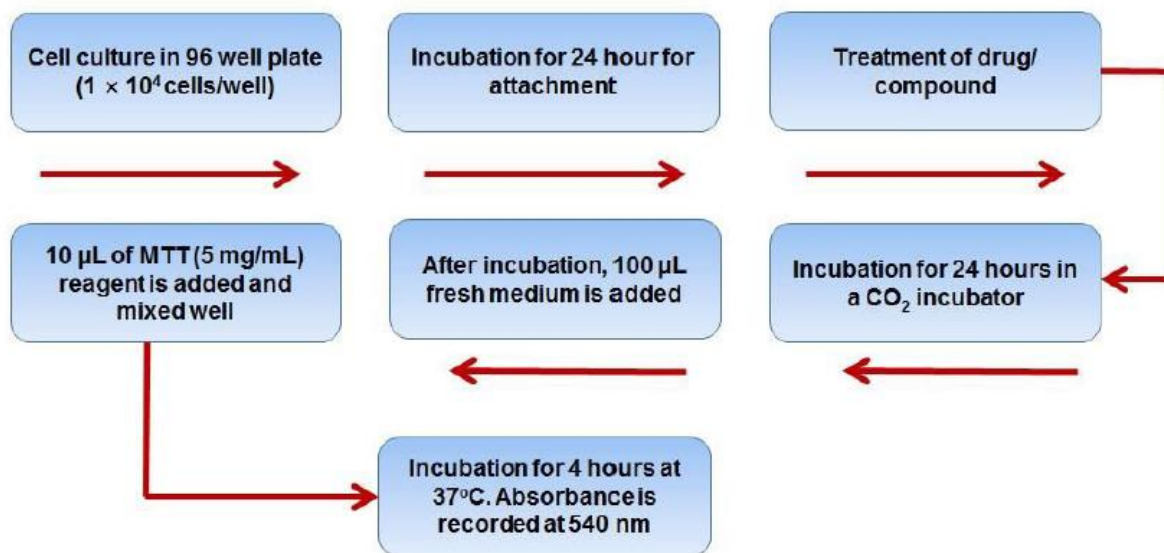
Procjenjuje se da kolonije rastu nekoliko centimetara na godinu, a zabilježen je veći rast u perifernim granama nego u središnjem dijelu.

Izmjerena maksimalna dob bila je 21 godinu, ali u prosjeku životna dob *Eunicelle cavolini* rijetko prelazi desetak godina. U središnjoj osi, rast kolonije zabilježen je kao niz koncentričnih prstena, poput stabla, jer rast slijedi sezonsko taloženje korteksne matrice. Brojanje prisutnih prstenova u bazalnoj središnjoj osi gorgonija na mikroskopu je još uvijek najprecizniji i najsigurniji način za određivanje starosti kolonije (38).

#### **1.4. MTT test i citotoksičnost**

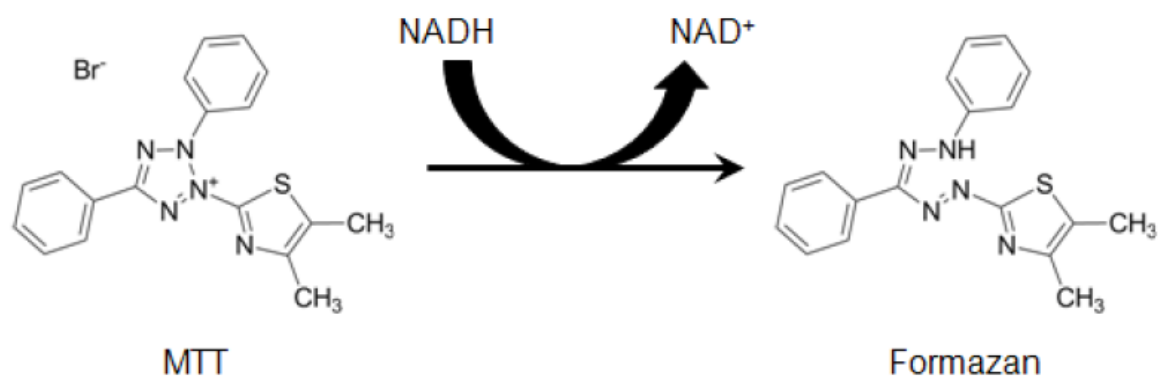
Kada se ispituje novi lijek, bilo iz prirodnih spojeva ili sintetski, treba ispitati njegovu sigurnost za stanicu domaćina ili citotoksični učinak na stanice raka. Takva ispitivanja su poznata kao testovi vijabilnosti stanica. Na primjer, izlaganje stanice tripan plavom obojenju može biti korisno za identificiranje vitalnih stanica pomoću mikroskopa. Mrtve stanice nisu obojene tripan plavom. Ova metoda se temelji na propusnosti stanične membrane. Međutim, bojanje tripan plavom ne može se koristiti za razlikovanje zdravih stanica i stanica koje su žive, ali gube funkcije stanica. Još jedna uobičajena metoda ispitivanja vitalnosti stanica je procjena razine laktat dehidrogenaze (LDH). LDH je prisutan unutar citoplazme. Kada se izgubi integritet stanične membrane, tada iz stanice izlazi citoplazmatski LDH te se povećava koncentracija LDH u izvanstaničnom mediju. Ova metoda je manje osjetljiva nego MTT test (39). Druge metode korištene za procjenu vijabilnosti stanica temeljene su na različitim staničnim funkcijama kao što su enzimska aktivnost, propusnost stanične membrane, prijanjanje stanica, proizvodnja ATP-a, proizvodnja koenzima i aktivnost preuzimanja nukleotida. Među njima je tetrazol (MTT) jedan od najčešćih metoda (40). MTT je bio prvi test homogenosti stanične vijabilnosti razvijen za 96-jažični format koji je bio pogodan za visoko propusno skeniranje (HTS). Tehnologija testa MTT široko je prihvaćena i ostaje popularna u akademskim laboratorijima, o čemu svjedoče tisuće objavljenih članaka. MTT supstrat se pripravlja u fiziološki uravnoteženoj otopini, dodaje se stanicama u kulturi, obično u konačnoj koncentraciji od 0,2 - 0,5 mg/mL, i

inkubira se 1 do 4 sata. Količina formazana (vjerojatno izravno proporcionalna broju živih stanica) mjeri se bilježenjem promjena u apsorbanciji na 570 nm pomoću spektrofotometra za očitavanje ploča. Ponekad se koristi referentna valna duljina od 630 nm, ali nije potrebna za većinu uvjeta ispitivanja (40).



**Slika 3** Shematski prikaz protokola za MTT test preživljenja stanica.

U MTT testu, uspostavlja se linearni odnos između metabolički aktivnih stanica i proizvedene boje, čime se omogućuje točna kvantifikacijska promjena u brzini stanične smrti ili proliferacije. MTT test je uobičajena primijenjena metoda za procjenu stanične vitalnosti i citotoksičnosti kod istraživanja lijekova. Zdrave i brzo rastuće stanice pokazuju visoke stope redukcije MTT do formazana, dok mrtve ili neaktivne stanice to ne čine. Krajnji proizvod redukcije MTT je formazan ljubičaste boje koji se može lako otopiti u DMSO-u. Vijabilnost u MTT testu povezana je s kvantifikacijom formazana na 540 nm koji je linearno povezan s enzimskom aktivnošću i posredno s brojem živih stanica. Intenzitet visoke ljubičaste boje označava veću vitalnost stanica, dok smanjenje purpurne boje označava smanjeni broj stanica i time citotoksičnost dane tvari (39).



**Slika 4** Strukturne formule MTT i formazana.

Postoje mnoge prednosti MTT testa, osobito njegova jednostavnost i učinkovitost, što ga čini pogodnijim za procjenu protuupalnih i antikancerogenih aktivnosti bilo kojeg test uzorka na preliminarnim razinama (40).

## **2. CILJ RADA**

### **SVRHA:**

Kako bi ispitali antiproliferativni učinak *Eunicelle cavolini*, u ovom diplomskom radu na dobivenim ekstraktima i određenim frakcijama *Eunicelle cavolini* ćemo provesti MTT test preživljenja stanica na HFF (eng. *human foreskin fibroblasts*) stanicama pri različitim koncentracijama.

### **CILJEVI:**

1. Analizirat ćemo u kojem otapalu tijekom ekstrakcija dobijemo najveću masu ekstrakata *Eunicelle cavolini* pri istim uvjetima.
2. Ispitat ćemo antiproliferativni učinak ekstrakata *Eunicelle cavolini* te njenih frakcija na fibroblaste MTT testom preživljenja stanica.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Uzorci**

Uzorci *Eunicelle cavolini* prikupljeni su u okolini grada Zadra tijekom 2019. godine u sklopu projekta BioProspecting Jadranskog mora.

Dobiveni koralji su se pohranjivali u hladnjaku na temperaturi od -80°C.

#### **3.2. Ekstrakcije koralja**

Prije svake ekstrakcije izvagali bi potrebnu masu uzorka (oko 50 g uzorka) te izvaganu masu usitnili štapnim mikserom u velikoj staklenoj čaši volumena 2L.

Ekstrakcije smo radili pomoću tri vrste otapala, smjese diklorometana i metanola (DCM/MeOH) u omjeru 3:1, petroletera te acetonitrila. Za svako otapalo koristili smo volumen od 400 mL koje smo dodali u čašu s usitnjenim uzorkom. Ekstrakcija se radila četiri sata pomoću magnetne miješalice, nakon čega smo dobiveni uzorak filtrirali preko Büchnerovog lijevka u tikvicu s okruglim dnom te nakon toga eliminirali otapalo na Buchi Rotavaporu dok nismo dobili suhi produkt. Pri korištenju smjese otapala DCM/MeOH na Rotavaporu, početni tlak je iznosio 400 mbara. Nakon što se tlak ustalio, spuštali bi tlak za 80-100 mbara do tlaka od 150 mbara. Nakon toga smo uključili opciju *Continuous* te je Rotavapor kontinuirano spuštao tlak do pojave suhog produkta. Kada smo koristili petroleter, početni tlak je iznosio 430 mbara, dok je početni tlak pri korištenju acetonitrila iznosio 400 mbara. Temperatura vodene kupelji kod svih ekstrakcija iznosila je 40°C. Ekstrakcije sa svakim otapalom su se ponavljale četiri puta.

Ekstrahirani koralji su se izvagali te pohranili u hladnjak na -80°C za daljnje analize.

### 3.3. Frakcioniranje uzoraka

Za frakcioniranje korištena je kolona promjera 2 cm. Pripremili smo 1,0288 g našeg uzorka dobivenog ekstrakcijom smjese diklorometana i metanola (3:1) te izvagali 60 g silika gela koji smo pomiješali s prvim otapalom cikloheksanom. Na dno kolone smo stavili napravljeni tuljac od vatrice, na vatu oko 1 cm natrijevog sulfata te izlili silika gel s otapalom. Na silika gel smo stavili prethodno izvagani uzorak, povrh njega oko 1 cm natrijevog sulfata te dodali samo otapalo.

Kolonu smo ispirali sa šest otapala u istom volumenu od 250 mL i omjerima prikazanim u Tablici 1.

Nakon svakog otapala, prikupljeni produkt u tikvici s okruglim dnom uparili smo na Buchi Rotavaporu dok ne bismo dobili suhi produkt koji smo potom izvagali. Svih šest tikvica pohranili smo u hladnjak na  $-80^{\circ}\text{C}$  za daljnje analize.

Pri korištenju Buchi Rotavapora temperatura vodene kupelji je iznosila  $40^{\circ}\text{C}$ . Početni tlak za prva četiri otapala prikazanih u Tablici 1 iznosio je 240 mbara, dok je za preostale dvije smjese otapala koje su sadržavale metanol iznosio 350 mbara. Nakon što se tlak ustalio, spuštali smo ga za oko 50 mbara do tlaka od 150 mbara kada smo koristili opciju *Continuous* te se tlak kontinuirano spuštao do dobivenog suhog produkta u tikvici.

**Tablica 2** Prikazani volumeni i omjeri otapala korištenih pri frakcioniranju *Eunicelle cavolini* na koloni.

Otapalo	Volumen/mL	Omjer
Cikloheksan	250	
Cikloheksan/Etil-acetat	250	75:25
Cikloheksan/Etil-acetat	250	50:50
Etil-acetat	250	
Etil-acetat/Metanol	250	95:5
Etil-acetat/Metanol	250	80:20

### 3.4. MTT test preživljenja stanica

Smjese koralja dobivene ekstrakcijom pomoću acetonitrila i diklormetana/metanola te frakcije dobivene uz pomoć otapala heksana i etil-acetata (75:25, 50:50), čistog etil-acetata i etil-acetata i metanola (80:20) su otopljene u DMSO-u u koncentraciji od 10 mg/ml pri 80°C i ultrazvukom u ultrazvučnoj kupelji.

Stanice (HFF – human foreskin fibroblasts) su nasađene u pločice s 96 jažica u koncentraciji 5000 stanica po jažici. Nakon 24 sata inkubacije u inkubatoru (5% CO<sub>2</sub> i 37°C) tretirane su razrjeđenjima u koncentracijama: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1, 10 i 50 µg/mL te 0.5 i 1 mg/mL. Nakon 72 sata inkubacije proveden je MTT test preživljenja stanica.

Pokusi su izvedeni u tetraplikatu u dva nezavisna pokusa.



## 4. REZULTATI

### 4.1. Određivanje najboljeg otapala pri ekstrakciji *Eunicelle cavolini*

Kako bi odredili u kojem otapalu dobijemo najveću masu ekstrakta *Eunicelle cavolini*, proveli smo tri ekstrakcije s tri različita otapala. Nakon usitnjenja 50,008 g koralja štapnim mikserom u velikoj staklenoj čaši volumena 2L, dodali smo 400 mL prvog otapala, smjesu diklormetana i metanola u omjeru 3:1. Postavili smo magnetsku miješalicu te smo nakon 4 sata miješanja filtrirali dobivenu tamno narančastu otopinu pomoću Buchnerovog lijevka u tikvicu s okruglim dnom. U već iskorištene koralje ponovno smo dodali otapalo u istom volumenu i omjeru te nastavili miješati. Sakupljenu tekućinu u tikvici s okruglim dnom postavili smo na Buchi Rotavapor kako bi eliminirali otapalo te dobili čisti produkt. Postupak smo ponovili 4 puta. Nakon svake sljedeće ekstrakcije smjesa otapala je postepeno gubila narančastu boju te nakon četvrte ekstrakcije boja otapala postala je sive boje. Naposljetku, izvagali smo dobiveni tamno narančasti uljasti produkt te dobili 2,031 g. Korištenjem acetonitrila kao otapala produkt je također bio tamno narančaste boje te smo vaganjem dobili 0,706 grama od početnih 50,035 g usitnjenih koralja. Kao posljednje otapalo koristili smo 400 mL petroletera pomoću kojeg smo dobili nešto slabije obojen narančasti produkt te 0,196 g od početnih 50,020 g koralja (Tablica 2).

**Tablica 3** Dobivene mase nakon ekstrakcija koralja magnetnom miješalicom pri korištenju određenog otapala u istom volumenu od 400 mL. Ekstrakcije su se ponavljale četiri puta po četiri sata.

Otapalo	DCM/MeOH	Petroleter	Acetonitril
Početna masa koralja/g	50,008	50,020	50,035
Masa dobivenog ekstrakta/g	2,031	0,196	0,706

#### 4.2. Ponavljanje ekstrakcija *Eunicelle cavolini* DCM/MeOH otapalom

Nakon prethodno izvedene ekstrakcije pomoću 400 mL otapala smjese diklormetana i metanola u omjeru 3:1 kod koje smo dobili 2,031 g produkta, ponovili smo ekstrakciju tri puta s različitim masama. Kod prve ekstrakcije izvagali smo 51,206 g koralja kojeg smo potom usitnili štapnim mikserom, dodali 400 mL smjese otapala te ekstrahirali i eliminirali otapalo. Nakon četvrtog ponavljanja izvagali smo tikvicu te dobili 1,904 g narančastog produkta (Tablica 3). Potom smo povećali gramažu tri puta te sukladno tome povećali i volumen otapala koji je sada iznosio 1200 mL. Također, nakon četiri puta ekstrahiranja te eliminiranja otapala, u prvoj tikvici od početnih 150,394 g usitnjenih koralja dobili smo 1,923 g suhog produkta. Naposljetku, pri zadnjoj ekstrakciji koju smo započeli s 150,262 g usitnjenih koralja dobili smo 1,651 g tamno narančastog produkta (Tablica 3).

**Tablica 4** Dobivene mase nakon četiri ponavljanja ekstrakcija u trajanju od četiri sata. Za mase od oko 50 g koristio se volumen od 400 mL, dok se za mase od oko 150 g koristio volumen od 1200 mL.

<b>Masa koralja /g</b>	50,008	51,206	150,394	150,262
<b>Masa dobivenog produkta/g</b>	2,031	1,904	1,923	1,651

#### 4.3. Frakcioniranje DCM/MeOH ekstrakta *Eunicelle cavolini*

Izvagali smo 1,0288 g ekstrakta dobivenog smjesom otapala diklormetana i metanola (3:1). Pripremili smo kolonu te koristili otapala redom prikazana u Tablici 4. Pri frakcioniranju s prvim otapalom, čistim heksanom, dobili smo lagano žuto obojenu tekućinu u tikvici s okruglim dnom. Kako bi dobili suhi produkt, otapalo smo uklonili na Buchi Rotavaporu te izvagali 5,1 g produkta. Dodavanjem etilacetata u heksan (75:25) na koloni se sve više eluirao ekstrakt te je kolona poprimila narančastu boju kao i sakupljena frakcija u tikvici. Nakon uparavanja dobili smo 111,7 g suhog narančastog produkta. Potom smo kolonu ispirali otapalom jednakog omjera heksana i etilacetata te dobili 11,8 g produkta. Posljednja dva korištena otapala bile su smjese etilacetata i metanola. Nakon uparavanja izvagali smo 9,6 g kod omjera 95:5, odnosno 16,2 g kod omjera 80:20. Posljednje tri tikvice su također bile obojene narančastom bojom.

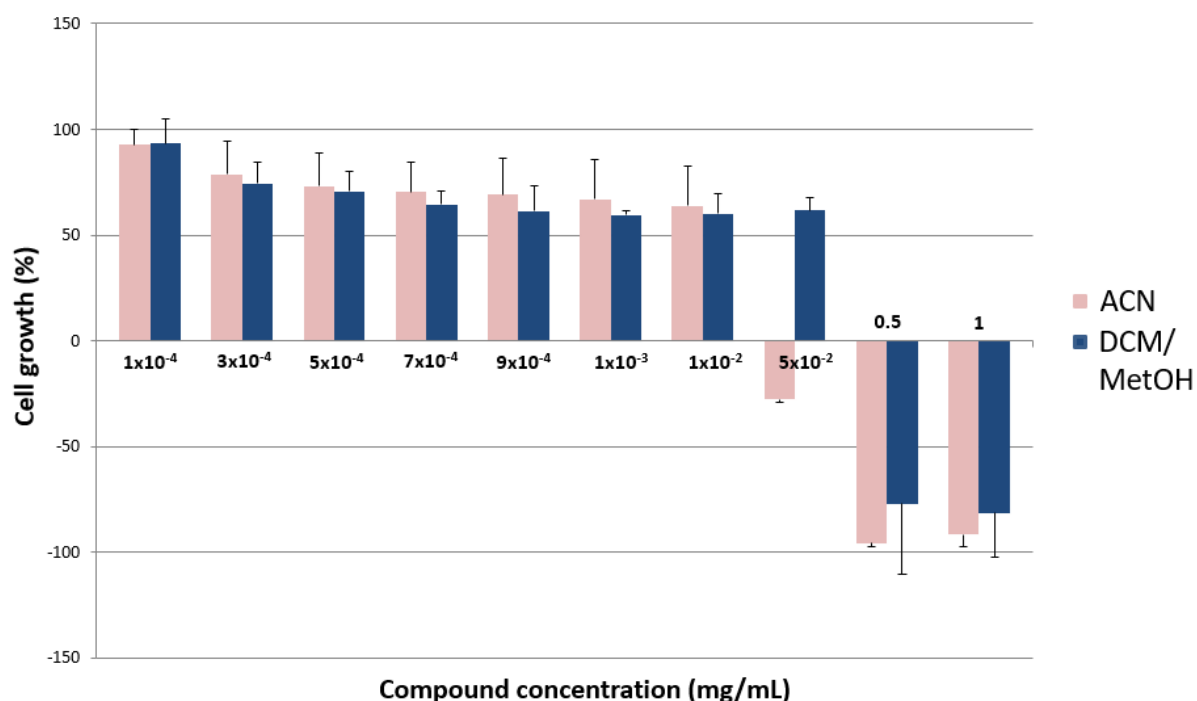
**Tablica 5** Prikazani omjeri različitih otapala korištenih na koloni te dobivene mase frakcija ekstrakta za svako otapalo. Za kolonu je korišten produkt ekstrakcije s DCM/MEOH otapalom.

Otapalo	Masa/mg
Heksan	5,1
Heksan/Etil-acetat (75:25)	111,7
Heksan/Etil-acetat (50:50)	25,6
Etil-acetat	11,8
Etil-acetat/Metanol (95:5)	9,6
Etil-acetat/Metanol (80:20)	16,2

#### 4.4. Analiza dobivenih ekstrakata i frakcija *Eunicelle cavolini* MTT testom preživljenja stanica

Kako bi odredili antiproliferativni učinak dobivenih ekstrakata i frakcija proveli smo MTT test. Ekstrakte dobivene uz pomoć otapala acetonitrila i smjese diklormetana i metanola te frakcije dobivene pomoću smjese otapala heksana i etilacetata (75:25, 50:50), čistog etilacetata i smjese etilacetata i metanola (80:20) otopili smo u DMSO-u u koncentraciji od 10 mg/mL pri 80°C u ultrazvučnoj kupelji. Potom smo nasadili HFF stanice u pločice s 96 jažica u koncentraciji 5000 stanica po jažici. Nakon 24 sata inkubacije (5% CO<sub>2</sub> i 37°C) tretirali smo ih prvo razrjeđenjima ekstrakta dobivenim uz pomoć otapala acetonitrila i smjese diklormetana i metanola u koncentracijama 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1, 10 i 50 µg/mL te 0.5 i 1 mg/mL. Povećanjem koncentracije smanjuje se postotak rasta stanica, odnosno povećava se antiproliferativni učinak ekstrakata koralja. Pri koncentracijama od 0.5 te 1 mg/mL možemo vidjeti citotoksično djelovanje, ali kod ekstrakata dobivenih acetonitrilom citotoksični učinak vidljiv je već pri koncentraciji od 50x10<sup>-2</sup> mg/mL (Slika 1).

Pri korištenju otapala acetonitrila inhibicija proliferacije stanica za 50% vidljiva je pri koncentraciji od 16.07  $\mu\text{g/ml}$ , a koncentracija koja je letalna za 50% stanica iznosi 197.99  $\mu\text{g/ml}$ . Kod smjese otapala diklorometana i metanola koncentracija koja izaziva 50%-tnu inhibiciju stanica iznosi 87.63  $\mu\text{g/ml}$ , dok letalna koncentracija za 50% stanica iznosi 412.58  $\mu\text{g/ml}$  (Tablica 5).



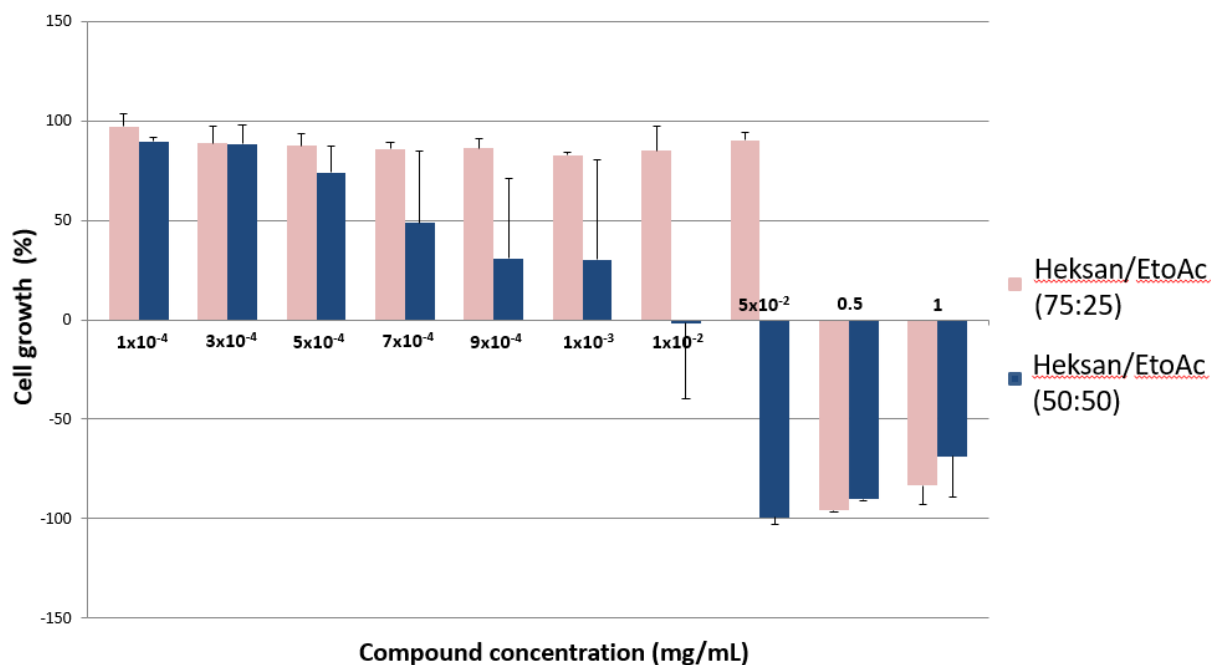
**Slika 5** Prikaz rezultata MTT testa. Stanice (HFF – human foreskin fibroblasts) su nasađene u pločice s 96 jažica u koncentraciji 5000 stanica po jažici. Nakon 24 sata inkubacije u inkubatoru (5%  $\text{CO}_2$  i  $37^\circ\text{C}$ ) tretirane su razrjeđenjima dobivenih ekstrakata otapalima acetonitrilom te smjesom diklorometana i metanola u koncentracijama: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1, 10 i 50  $\mu\text{g/mL}$  te 0.5 i 1 mg/mL prikazanih na apscisi. Nakon 72 sata inkubacije proveden je MTT test preživljenja stanica. Ordinata označava postotak rasta stanica pri navedenim koncentracijama.

**Tablica 6** Izračunate koncentracije  $IC_{50}$  i  $LC_{50}$  za otapala acetonitril te smjesu otapala diklormetan i metanol nakon provedenog MTT testa preživljenja stanica. Prikazane su srednje aritmetičke vrijednosti koncentracija  $\pm$  standardna pogreška.

Otapalo	Acetonitril (ACN)	Diklormetan/Metanol (DCM/MeOH)
<b>IC<sub>50</sub> (µg/ml)</b>	16.07 $\pm$ 7.06	87.63 $\pm$ 28.11
<b>LC<sub>50</sub> (µg/ml)</b>	197.99 $\pm$ 1.34	412.58 $\pm$ 93.41

Ponovili smo postupak pripreme MTT testa te smo nakon inkubacije HFF stanice tretirali razrjeđenjima frakcija dobivenih smjesama otapala heksana i etilacetata (75:25, 50:50) u koncentracijama 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1, 10 i 50 µg/mL te 0.5 i 1 mg/mL. Kod omjera 75:25 smjese heksana i etilacetata vidljiv je blagi antiproliferativni učinak koji je najveći pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-3}$  mg/mL. Kod koncentracija 0.5 te 1 mg/mL vidljiv je citotoksični učinak na HFF stanice. Kod istog omjera heksana i etilacetata povećanjem koncentracije opada postotak rasta stanica te je već pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-2}$  mg/mL vidljivo citotoksično djelovanje (Slika 2).

Koncentracija koja inhibira stanice za 50% kod smjese otapala heksana i etilacetata omjera 75:25 iznosi 147.77 µg/mL, dok kod omjera 50:50 iste smjese iznosi 0.69 µg/mL. Pripadajuća  $LC_{50}$  koncentracija za omjer 75:25 iznosi 389.401 µg/mL, a za omjer 50:50 iznosi 29.76 µg/mL (Tablica 6).



**Slika 6** Prikaz rezultata MTT testa. Stanice (HFF – human foreskin fibroblasts) su nasađene u pločice s 96 jažica u koncentraciji 5000 stanica po jažici. Nakon 24 sata inkubacije u inkubatoru (5% CO<sub>2</sub> i 37°C) tretirane su razrjeđenjima dobivenih frakcija smjesama heksana i etila-acetata (75:25, 50:50) u koncentracijama: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1, 10 i 50 µg/mL te 0.5 i 1 mg/mL prikazanih na apscisi. Nakon 72 sata inkubacije proveden je MTT test preživljenja stanica. Ordinata označava postotak rasta stanica pri navedenim koncentracijama.

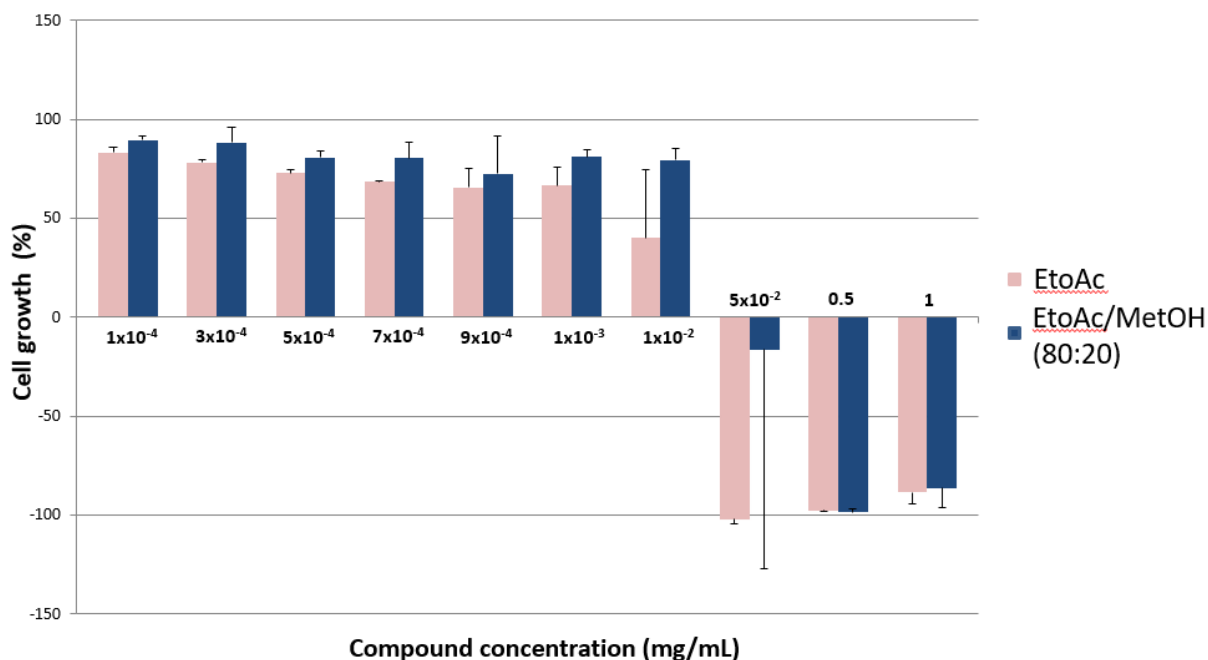
**Tablica 7** Izračunate koncentracije  $IC_{50}$  i  $LC_{50}$  za smjese otapala heksana i etilacetata (75:25, 50:50), čistog etilacetata te smjese etilacetata i metanola (80:20) nakon provedenog MTT testa preživljenja stanica. Prikazane su srednje aritmetičke vrijednosti koncentracija  $\pm$  standardna pogreška.

Frakcije	Heksan/EtoAc (75:25)	Heksan/Eto Ac (50:50)	EtoAc	EtoAc/MeOH (80:20)
<b>IC<sub>50</sub></b> <b>(<math>\mu</math>g/ml)</b>	147.77 $\pm$ 7.45	0.69 $\pm$ 2.81	6.59 $\pm$ 6.27	2.23 $\pm$ 4.71
<b>LC<sub>50</sub></b> <b>(<math>\mu</math>g/ml)</b>	389.401 $\pm$ 1.88	29.76 $\pm$ 7.94	35.31 $\pm$ 4.09	234.08 $\pm$ 227.74

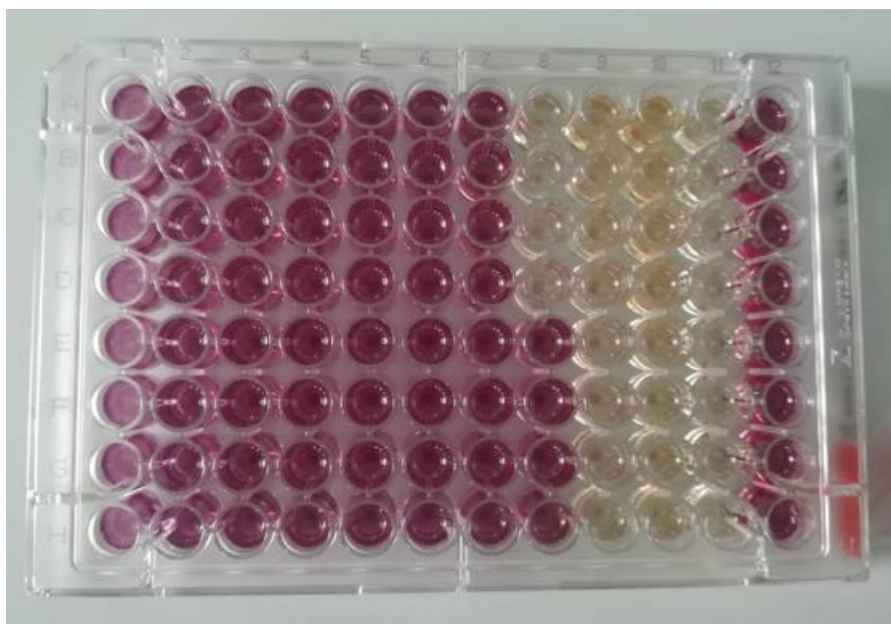
Kod posljednjeg MTT testa preživljenja stanica, nakon inkubacije, HFF stanice smo tretirali razrjeđenjima frakcija dobivenih čistim otapalom etilacetatom te smjesom etil-acetata i metanola u omjeru 80:20 u koncentracijama 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1, 10 i 50  $\mu$ g/mL te 0.5 i 1 mg/mL. Kod čistog etilacetata vidljivo je blago opadanje postotka rasta stanica pri rastu koncentracije, dok je kod smjese otapala vidljiv blagi antiproliferativni učinak koji je najveći pri koncentraciji od  $9 \times 10^{-4}$  mg/mL. Za oba otapala citotoksično djelovanje možemo vidjeti već pri koncentraciji od  $5 \times 10^{-2}$  mg/mL.

Pri korištenju čistog otapala etilacetata inhibicija proliferacije stanica za 50% vidljiva je pri koncentraciji od 6.59  $\mu$ g/ml, a koncentracija koja je letalna za 50% stanica iznosi 35.31  $\mu$ g/ml. Kod smjese otapala etilacetata i metanola u omjeru 80:20 koncentracija koja izaziva 50%-tnu inhibiciju stanica iznosi 2.23  $\mu$ g/ml, dok letalna koncentracija za 50% stanica iznosi 234.08  $\mu$ g/ml (Tablica 6).





**Slika 7** Prikaz rezultata MTT testa. Stanice (HFF – human foreskin fibroblasts) su nasađene u pločice s 96 jažica u koncentraciji 5000 stanica po jažici. Nakon 24 sata inkubacije u inkubatoru (5% CO<sub>2</sub> i 37°C) tretirane su razrjeđenjima dobivenih frakcija otapalom etila-acetatom te smjesom etil-acetata i metanola (80:20) u koncentracijama: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1, 10 i 50 µg/mL te 0.5 i 1 mg/mL prikazanih na apscisi. Nakon 72 sata inkubacije proveden je MTT test preživljenja stanica. Ordinata označava postotak rasta stanica pri navedenim koncentracijama.



**Slika 8** Slika prikazuje izgled rezultata MTT testa. Stanice (HFF – human foreskin fibroblasts) su nasađene u pločice s 96 jažica u koncentraciji 5000 stanica po jažici. Nakon 24 sata inkubacije u inkubatoru (5% CO<sub>2</sub> i 37°C) tretirane su razrjeđenjima u različitim koncentracijama. Nakon 72 sata inkubacije proveden je MTT test preživljenja stanica. Ljubičasta boja označava veću vitalnost stanica, dok smanjenje intenziteta boje označava smanjeni broj stanica i time citotoksičnost dane tvari.

## 5. DISKUSIJA

Morska farmakologija je nova disciplina koja istražuje morski okoliš u potrazi za potencijalnim lijekovima. Morski okoliš predstavlja otprilike 70% zemljine površine, a pronađena je i velika biološka raznolikost koja se sastoji od 36 koljena (41). U posljednja dva desetljeća provedeno je veliko istraživanje morskih spojeva i zabilježen je širok raspon aktivnosti, kao što je antivirusna, antibakterijska, antifungalna, antiparazitna, antitumorska te antiupalna aktivnost (7). Prema tome, morski spojevi bi se mogli razviti kao sastojci za kozmetičku, farmaceutsku i prehrambenu industriju (42). Morski bioaktivni spojevi također mogu postati opcija za liječenje infekcija otpornih na lijekove nudeći nove strukturne modele (43). Ova hipoteza je također prenosiva na novi razvoj lijekova protiv raka. Također, postoji hipoteza da je visoka taksonomska raznolikost povezana sa širokom kemijskom raznolikošću prirodnih proizvoda (44). Ova velika raznolikost sekundarnih metabolita pruža morskim organizmima mogućnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima, a posljedično tome, ova raznolikost nudi bogat izvor lijekova koji mogu biti potencijalni kandidati za liječenje bolesti (45,46). To je razlog zašto morski organizmi predstavljaju obećavajući izvor bioaktivnih molekula (47).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje antiproliferativnog učinka na fibroblaste ljudskog prepucija kako bi otkrili ako su dobiveni ekstrakti i frakcije *Eunicelle cavolini*, odnosno spojevi u njima, od interesa za daljnje istraživanje te potencijalne mete za mogući razvoj novog lijeka.

Prvi korak je bila ekstrakcija pomoću tri različita otapala s istom početnom masom te pri istim uvjetima. Ekstrakcija pomoću smjese otapala diklorometana i metanola u omjeru 3:1 dala je najveću masu od 2.031 g, odnosno oko tri puta više od mase ekstrakta dobivenog pomoću acetonitrila te deset puta više od ekstrakcije petroleterom. Polarne komponente su topljive u polarnim otapalima, a nepolarne komponente u nepolarnim otapalima. Budući da su smjesa metanola i diklorometana te acetonitril polarna otapala, a petroleter nepolarno otapalo, možemo zaključiti kako

najveću masu ekstrakta dobijemo u što polarnijem otapalu što bi moglo značiti da u našim usitnjenim koraljima prevladavaju polarniji spojevi.

Kako bi dobili frakcije za testiranje antiproliferativnog učinka na fibroblaste koristili smo kolonu sa silika gelom te oko 1 g uzorka ekstrakta dobivenog smjesom otapala diklorometana i metanola. Kolonu smo ispirali sa šest različitih otapala, od nepolarnog heksana do najpolarnije smjese etil-acetata i metanola (80:20). Najveće mase frakcija dobili smo korištenjem smjese otapala heksana i etil-acetata (75:25, 50:50). Najmanje mase dobili smo frakcioniranjem pomoću čistog heksana te smjese etil-acetat i metanola (95:5) te ove frakcije nismo koristili u MTT testovima zbog dobivene premale gramaže produkta. Budući da nismo radili tankoslojnu kromatografiju nakon svakog otapala, moguće je da smo u nekoj frakciji imali smjesu otapala te bi se kolona trebala ponoviti za buduća istraživanja kako bi dobili preciznije rezultate.

Najjači antiproliferativni učinak vidljiv je u djelovanju uzorka pripremljenog pomoću smjese heksana i etil-acetata (50:50) gdje je inhibicija proliferacije stanica za 50% vidljiva već pri koncentraciji od 0.69 µg/ml. Sličan, ali slabiji utjecaj na proliferaciju stanica imali su uzorci pripremljeni pomoću smjese etil-acetata i metanola (80:20) i čistog etil-acetata. Najmanja koncentracija potrebna za ubijanje 50% stanica također je dobivena kod uzorka pripremljenog pomoću smjese heksana i etil-acetata (50:50) koja iznosi 29.76 µg/ml. Za usporedbu, najveća letalna koncentracija za 50% stanica dobivena je kod ekstrakta dobivenog pomoću smjese otapala diklorometana i metanola te iznosi visokih 412.58 µg/ml. Spoj od interesa mogao bi se nalaziti u frakciji dobivenoj smjesom heksana i etil-acetata (50:50) pošto je naš MTT pokazao najjači antiproliferativni učinak upravo u toj frakciji. Sljedeći korak u daljnjem istraživanju bi trebala biti identifikacija struktura i relativnih konfiguracija spojeva u spomenutoj frakciji pomoću NMR spektroskopije. Nakon toga, na dobivenim spojevima bi se ponovno trebao ispitati antiproliferativni učinak te vidjeti ako bi neki od tih spojeva mogao biti spoj od interesa za mogući razvoj novog lijeka.

Već je utvrđeno da će se upotreba bioaktivnih spojeva morskog podrijetla povećati u narednim godinama kao alternativa za otkrivanje novih lijekova. Ipak, potrebno je razmotriti neka ograničenja pri traženju morskih spojeva iz beskralješnjaka, uključujući male količine proizvoda koje dobijemo od tih organizama, potencijalnu prisutnost toksina i anorganskih soli dobivenih iz organizama ili njihovog okoliša te široku raznolikost kemijskih spojeva koje proizvodi neki organizam.

Da bi se razvili in vitro testovi, potrebne su male količine, međutim, u pretkliničkim studijama, često su potrebne stotine grama do kilograma koje se koriste u svrhe ispitivanja potencijalnog lijeka. Trenutno je ova prepreka prevladana kombinacijom novih tehnika u kemijskoj sintezi i poboljšanju žetve, akvakulture ili procesa izolacije (48). Drugi ograničavajući čimbenik u korištenju morskih organizama je potencijalna prisutnost toksina iz organizama ili ekološkog podrijetla i prisutnost anorganskih soli. Ove vrste mogu ugroziti uporabu sirovih ekstrakta u svrhe in vitro ispitivanja. Često je stvaranje toksina od strane morskog beskralješnjaka pokazatelj da je ovaj organizam izvor bioaktivnih spojeva. Stoga je potrebno identificirati moguće kontaminante (anorganske soli i toksini) kako bi se morski ekstrakti uskladili s in vitro testiranjem. Trenutno su dostupne mnoge analitičke tehnike za analizu, izolaciju, karakterizaciju i odvajanje aktivnih spojeva u morskim ekstraktima (49,50). Ovisnost raznolikosti kemijskih spojeva (kemotip) koje organizam proizvodi o uvjetima okoline može se riješiti pomoću kontroliranih tehnika akvakulture. Kontrolirana akvakultura ne samo da bi mogla izbjeći problem iscrpljivanja morskih resursa, već bi mogla biti i opcija za proizvodnju potrebne biomase u velikoj mjeri koja je potrebna za otkrivanje potencijalnog lijeka. Osim toga, poboljšanja u tehnikama kemijske sinteze i kombinatorne kemije također pružaju zadovoljavajuća rješenja (51). Konačno, molekularni ciljevi za većinu novootkrivenih morskih prirodnih spojeva su nepoznati; prema tome, tehnike visokog učinka, s Omicsom i virtualnim screeningom, trebaju biti integrirane kako bi se prevladala ograničenja in vitro tehnika (52).

## 6. ZAKLJUČAK

Ekstrakcije koralja *Eunicelle cavolini* izvedene su korištenjem polarne smjese otapala diklorometana i metanola u omjeru 3:1, polarnog acetonitrila te nepolarnog otapala petroletera. Pokazali smo kako se naš uzorak najbolje otapa u što polarnijem otapalu koje je u ovom slučaju smjesa otapala diklorometana i metanola. Najmanju masu dobili smo u nepolarnom petroleteru stoga možemo pretpostaviti kako u našem uzorku prevladavaju polarniji spojevi. Nakon provedenih MTT testova, najmanju koncentraciju potrebnu za inhibiciju proliferacije 50% stanica imao je uzorak pripremljen pomoću smjese heksana i etil-acetata (50:50). Također, isti taj uzorak je imao najmanju koncentraciju koja je letalna za 50% stanica. Uzorak koji ima najslabiji antiproliferativni učinak je onaj pripremljen pomoću smjese heksana i etil-acetata (75:25). Ekstrakt dobiven smjesom diklorometana i metanola ima najveću letalnu koncentraciju koja ubija stanice za 50%. Budući da je frakcija dobivena pomoću smjese heksana i etil-acetata (50:50) pokazala najviše aktivnosti na fibroblastima, potrebna je identifikacija struktura spojeva te daljnja istraživanja svakog pojedinog spoja kako bi potencijalno dobili spoj koji bi mogao imati antivirusnu, antibakterijsku, antitumorsku ili antiupalnu aktivnost.

## 7. LITERATURA

1. Kim S-K, Pallela R. Medicinal Foods from Marine Animals. In: Advances in Food and Nutrition Research [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2019 May 25]. p. 1–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124160033000019>
2. Ramsey U, Bird C, Shacklock P, Laycock M, Wright J. Kainic acid and 1'-hydroxykainic acid from Palmariales [Internet]. Natural Toxins. 1994 [cited 2019 May 25]. Available from: <https://eurekamag.com/research/008/932/008932561.php>
3. Bergmann W, Schedl HP, Low EM. Contributions to the study of marine products; microcionasterol and other sterols of sponges. J Org Chem. 1945 Nov;10:580–6.
4. Mudit M, El Sayed KA. Cancer control potential of marine natural product scaffolds through inhibition of tumor cell migration and invasion. Drug Discov Today. 2016 Nov;21(11):1745–60.
5. De Zoysa M. Medicinal Benefits of Marine Invertebrates. In: Advances in Food and Nutrition Research [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2019 May 25]. p. 153–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124160033000093>
6. Gerwick WH, Moore BS. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. Chem Biol. 2012 Jan;19(1):85–98.
7. Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products. Nat Prod Rep. 2016;33(3):382–431.
8. Saikia S, Kolita B, Dutta PP, Dutta DJ, Neipihoi, Nath S, et al. Marine steroids as potential anticancer drug candidates: In silico investigation in search of inhibitors of Bcl-2 and CDK-4/Cyclin D1. Steroids. 2015 Oct;102:7–16.
9. Hu G-P, Yuan J, Sun L, She Z-G, Wu J-H, Lan X-J, et al. Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained between 1985 and 2008. Mar Drugs. 2011 Mar 29;9(4):514–25.

10. Leal MC, Madeira C, Brandão CA, Puga J, Calado R. Bioprospecting of Marine Invertebrates for New Natural Products — A Chemical and Zoogeographical Perspective. *Molecules*. 2012 Aug 16;17(8):9842–54.
11. Voultsiadou E, Vafidis D. Marine invertebrate diversity in Aristotle's zoology. *Contrib Zool*. 2007;76(2):103–20.
12. Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*. 2003 Jun 15;8(12):536–44.
13. D'Incalci M, Badri N, Galmarini CM, Allavena P. Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. *Br J Cancer*. 2014 Aug 12;111(4):646–50.
14. Fontana A, Cavaliere P, Wahidullah S, Naik CG, Cimino G. A new antitumor isoquinoline alkaloid from the marine nudibranch *Jorunna funebris*. 2000 [cited 2019 May 21]; Available from: <http://drs.nio.org/drs/handle/2264/1638>
15. Identification of Renieramycin A as an Antileishmanial Substance in a Marine Sponge *Neopetrosia* sp. [Internet]. [cited 2019 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3783859/>
16. d.o.o MJ. HALAVEN 0,44 mg/ml otopina za injekciju — Mediatelly Baza Lijekova [Internet]. [cited 2019 May 21]. Available from: <https://mediatelly.co/hr/drugs/Q6qen5H0wVUsRijv3vGbLPIQ6gV/halaven-0-44-mg-ml-otopina-za-injekciju>
17. Scarpace SL. Eribulin mesylate (E7389): review of efficacy and tolerability in breast, pancreatic, head and neck, and non-small cell lung cancer. *Clin Ther*. 2012 Jul;34(7):1467–73.
18. De Souza MVN. (+)-discodermolide: a marine natural product against cancer. *ScientificWorldJournal*. 2004 Jun 11;4:415–36.
19. Zonder JA, Shields AF, Zalupski M, Chaplen R, Heilbrun LK, Arlauskas P, et al. A phase II trial of bryostatin 1 in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2001 Jan;7(1):38–42.



20. Caplan SL, Zheng B, Dawson-Scully K, White CA, West LM. Pseudopterosin A: Protection of Synaptic Function and Potential as a Neuromodulatory Agent. *Mar Drugs* [Internet]. 2016 Mar 10 [cited 2019 May 23];14(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4820309/>
21. Mayer AM, Jacobson PB, Fenical W, Jacobs RS, Glaser KB. Pharmacological characterization of the pseudopterosins: novel anti-inflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral, *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Life Sci*. 1998;62(26):PL401-407.
22. Gopal AK, Chen R, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, et al. Durable remissions in a pivotal phase 2 study of brentuximab vedotin in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2015 Feb 19;125(8):1236–43.
23. Depenbrock H, Peter R, Faircloth G, Manzanares I, Jimeno J, Hanauske A. In vitro activity of aplidine, a new marine-derived anti-cancer compound, on freshly explanted clonogenic human tumour cells and haematopoietic precursor cells. *Br J Cancer*. 1998 Sep;78(6):739–44.
24. Ott PA, Pavlick AC, Johnson DB, Hart LL, Infante JR, Luke JJ, et al. A phase II study of glembatumumab vedotin (GV), an antibody-drug conjugate (ADC) targeting gpNMB, in advanced melanoma. *J Clin Oncol*. 2017 May 20;35(15\_suppl):109–109.
25. Advani RH, Lebovic D, Chen A, Brunvand M, Goy A, Chang JE, et al. Phase I Study of the Anti-CD22 Antibody–Drug Conjugate Pinatuzumab Vedotin with/without Rituximab in Patients with Relapsed/Refractory B-cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2017 Mar 1;23(5):1167–76.
26. Anderson HJ, Coleman JE, Andersen RJ, Roberge M. Cytotoxic peptides hemiasterlin, hemiasterlin A and hemiasterlin B induce mitotic arrest and abnormal spindle formation. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996 Dec 2;39(3):223–6.

27. Liu J, Zhao D, He W, Zhang H, Li Z, Luan Y. Nanoassemblies from amphiphilic cytarabine prodrug for leukemia targeted therapy. *J Colloid Interface Sci.* 2017 Feb;487:239–49.
28. Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Kurokawa T, Hashimoto S, et al. Anticancer effects of gemcitabine are enhanced by co-administered iRGD peptide in murine pancreatic cancer models that overexpressed neuropilin-1. *Br J Cancer.* 2014 Mar;110(6):1481–7.
29. de Bono JS, Kristeleit R, Tolcher A, Fong P, Pacey S, Karavasilis V, et al. Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of LAQ824, a Hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitor with a Heat Shock Protein-90 Inhibitory Profile, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 15;14(20):6663–73.
30. Sagar S, Kaur M, Minneman KP. Antiviral Lead Compounds from Marine Sponges. *Mar Drugs.* 2010 Oct 11;8(10):2619–38.
31. Bergmann W, Feeney RJ. THE ISOLATION OF A NEW THYMINE PENTOSIDE FROM SPONGES1. *J Am Chem Soc.* 1950 Jun 1;72(6):2809–10.
32. BERGMANN W, FEENEY RJ. CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXII. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. I.1. *J Org Chem.* 1951 Jun 1;16(6):981–7.
33. Doshi GM, Aggarwal GV, Martis EA, Shanbhag PP. Novel Antibiotics from Marine Sources. :18.
34. Springer handbook of marine biotechnology. 1st edition. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
35. Berrue F, Kerr RG. Diterpenes from gorgonian corals. *Nat Prod Rep.* 2009;26(5):681.
36. Jensen PR, Harvell CD, Wirtz K, Fenical W. Antimicrobial activity of extracts of Caribbean gorgonian corals. *Mar Biol.* 1996 Apr;125(2):411–9.
37. Sini M, Kipson S, Linares C, Koutsoubas D, Garrabou J. The Yellow Gorgonian *Eunicella cavolini*: Demography and Disturbance Levels


- across the Mediterranean Sea. Bianchi CN, editor. PLOS ONE. 2015 May 5;10(5):e0126253.
38. Velimirov B. MORPHOLOGICAL VARIATIONS IN THE MEDITERRANEAN SEA FAN EUNICELLA CA VOLINI (COELENTERATA: GORGONACEA) IN RELATION TO EXPOSURE, COLONY SIZE AND COLONY REGION. :14.
  39. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. Bangladesh J Pharmacol. 2017 Apr 8;12(2):8.
  40. Sittampalam S, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M. Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences Bethesda (MD); 2018. 1340 p.
  41. Pomponi SA. The bioprocess-technological potential of the sea. In: Osinga R, Tramper J, Burgess JG, Wijffels RH, editors. Progress in Industrial Microbiology [Internet]. Elsevier; 1999 [cited 2019 May 25]. p. 5–13. (Marine Bioprocess Engineering; vol. 35). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079635299800927>
  42. Lee S-M, Lee Y-R, Cho K-S, Cho Y-N, Lee HA, Hwang D-Y, et al. Stalked sea squirt (*Styela clava*) tunic waste as a valuable bioresource: Cosmetic and antioxidant activities. Process Biochem. 2015 Nov;50(11):1977–84.
  43. Abdelmohsen UR, Balasubramanian S, Oelschlaeger TA, Grkovic T, Pham NB, Quinn RJ, et al. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. Lancet Infect Dis. 2017 Feb;17(2):e30–41.
  44. Williams PG. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. Trends Biotechnol. 2009 Jan;27(1):45–52.
  45. Jimeno J, Faircloth G, Sousa-Faro J, Scheuer P, Rinehart K. New Marine Derived Anticancer Therapeutics – A Journey from the Sea to Clinical Trials. Mar Drugs. 2004 Feb 25;2(1):14–29.
  46. Senthilkumar K, Kim S-K. Marine Invertebrate Natural Products for Anti-Inflammatory and Chronic Diseases. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:1–10.


47. Nikapitiya C. Bioactive Secondary Metabolites from Marine Microbes for Drug Discovery. In: *Advances in Food and Nutrition Research* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2019 May 25]. p. 363–87. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012416003300024X>
48. Newman DJ. Developing natural product drugs: Supply problems and how they have been overcome. *Pharmacol Ther.* 2016 Jun;162:1–9.
49. Grienke U, Silke J, Tasdemir D. Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. *Food Chem.* 2014 Jan;142:48–60.
50. Tornero V, Hanke G. Chemical contaminants entering the marine environment from sea-based sources: A review with a focus on European seas. *Mar Pollut Bull.* 2016 Nov;112(1–2):17–38.
51. Leal MC, Calado R, Sheridan C, Alimonti A, Osinga R. Coral aquaculture to support drug discovery. *Trends Biotechnol.* 2013 Oct;31(10):555–61.
52. Cuevas C, Francesch A. Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Nat Prod Rep.* 2009;26(3):322.

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNJE INFORMACIJE

Vukić Klara

 Prijelaz Franje Paravića 13, 51000 Rijeka (Hrvatska)

 (+385) 91 8835424

 klara.vuk@gmail.com

### RADNO ISKUSTVO

siječanj 2015.–prosinac 2015.      Administrativni asistent / administrativna asistentica  
Jadran pismo d.o.o., Rijeka (Hrvatska)

prosinac 2016.–danas      Administrativni poslovi  
Plodine d.d., Rijeka (Hrvatska)

svibanj 2016.–lipanj 2016.      Studentska praksa  
Jadran galenski laboratorij d.d., Rijeka (Hrvatska)  
Praksa na odjelu Kontrole kvalitete

2018.–2019.      Diplomant  
Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)  
Rad u laboratoriju

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2005.–2009.      Prva sušačka hrvatska gimnazija, Rijeka (Hrvatska)

2013.–2016.      Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova  
Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

2016.–danas      Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)  
Smjer Medicinska kemija

## OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski jezik

Strani jezici

RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
C1	C1	C1	C1	C1

Engleski jezik

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik  
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine

Spremna na timski rad i vrlo kooperativna osoba  
 Mogućnost prilagodbe novim situacijama  
 Dobre komunikacijske vještine

Organizacijske /  
 rukovoditeljske vještine

Organizacijske vještine stvorene radom u laboratoriju

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

Dobro znanje MS Office-a

Poznavanje rada u programima (Avogadro, PyMOL, Chimera, VMD)